

微环境对细胞的影响以及仿生学在组织工程支架中的应用

张志强 黄向华* 赵林远

(河北医科大学附属第二医院 石家庄 050000)

摘要 微环境影响着细胞的增殖、迁移、分化以及细胞功能,细胞微环境影响细胞命运的因素包括细胞之间相互作用、细胞与细胞外基质相互作用、可溶性信号分子以及缺氧和营养对细胞的影响。组织工程支架的制备就是要利用仿生学原理最大程度模拟细胞微环境,从而应用于细胞行为研究以及临床治疗。全面了解细胞微环境对细胞的影响因素是制备组织工程支架的重要条件,而组织工程支架的研究也进一步推动了细胞微环境对细胞影响的认识。组织工程支架研究在组织工程研究中仍具有广阔前景,新的制备工艺也在组织工程支架研究中发挥着巨大推动作用。

关键词 微环境 细胞 仿生学 组织工程支架

中图分类号 Q819

组织工程是一门生命科学与工程学相结合的新兴学科。其核心内容是利用细胞和支架复合组成三维复合体,移植到体内,暂时或永久替代损伤及缺损的组织或器官。细胞的生长、分化以及功能的发挥受到来自原位组织中各种物理、化学因素的影响,包括细胞之间、细胞与细胞外基质之间的相互作用以及温度、营养、细胞因子等条件的影响。细胞所处的这种组织环境称为微环境。干细胞的微环境又称为干细胞 Niche (干细胞壁龛)^[1],其在干细胞的生长和功能的维持和调节中起到重要作用。微环境对细胞增殖分化的影响主要有 3 个方面:(1)细胞与细胞的相互影响;(2)细胞与细胞外基质的相互作用影响;(3)可溶性信号分子的影响^[2]。细胞外基质是细胞微环境的重要组成部分,对细胞的生长分化、基因和功能表达发挥着巨大影响。细胞支架的制备要最大程度地模拟细胞微环境,以更好地研究细胞的活动机制以及应用于组织工程。本文对微环境对细胞的影响以及仿生学在组织工程支架中的应用作一综述,为组织工程支架研究提供参考。

1 微环境对细胞的影响

组织微环境不仅影响正常细胞的生理过程,也在细胞病理过程中起着重要作用。作用的因素包括:细胞间、细胞与基质、可溶性信号分子、缺氧、营养等。

1.1 细胞与细胞的相互影响

细胞间的相互影响存在于同型和异型细胞之间。间质细胞是存在于功能细胞之间的一类细胞,最多的是成纤维细胞。成纤维细胞可以分泌多种细胞外基质和生长因子,调节功能细胞的生长分化。研究人员发现间质细胞对上皮细胞的生长不仅起到结构支持作用,还与上皮细胞的生长分化及功能产生影响^[3-6]。口腔黏膜上皮和间质细胞相互作用在口腔黏膜再生过程中不可缺少^[7]。间质细胞对前体细胞和干细胞的分化也发挥重要作用。张媛等^[8]将耳蜗间质细胞与耳蜗毛细胞前体细胞——大上皮嵴细胞共培养,可以诱导大上皮嵴细胞向毛细胞和支持细胞分化。张雯碧等^[9]利用小鼠间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)与子宫内膜间质细胞间接共培养,成功诱导 MSC 向子宫内膜上皮细胞方向分化。陈寅等^[10]用人骨髓间充质干细胞与人胚肺间质细胞(MRC-5)共培养,加入条件培养基培养 10 天后,发现部分骨髓间充质干细胞由长梭

形变为上皮样形态,并出现了Ⅱ型肺泡上皮样细胞中表面活性蛋白C蛋白的表达。Liu等^[11]应用脂肪间充质干细胞与尿路上皮细胞直接接触共培养可以成功诱导脂肪间充质干细胞向尿路上皮分化,在直接接触共培养2周后发现分化的干细胞表达CK18和UPIb(尿溶蛋白),而间接接触共培养以及用直接接触共培养的培养基作为条件培养基诱导脂肪间充质干细胞未能使其向尿路上皮细胞分化。本研究提示单纯的可溶性因子不能单独诱导脂肪间充质干细胞分化为尿路上皮,细胞间的物理接触影响干细胞分化。细胞间相互作用不仅存在于生理过程中,同时也影响着病理过程的进程。Atula等^[12]将来源于同一喉鳞状细胞癌患者的正常皮肤和肿瘤的成纤维细胞分别与喉癌细胞在3D细胞培养系统共培养,发现来源于正常皮肤的成纤维细胞下调了癌细胞的恶性表型,而肿瘤成纤维细胞与癌细胞的直接接触最大程度上调了癌细胞的恶性表型。细胞间的相互作用不仅包括直接接触的作用,还包括细胞自分泌和旁分泌引起的化学信号变化。

1.2 细胞与细胞外基质相互作用的影响

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是存在于细胞之间的动态三维结构。不同类型的ECM由不同组分按特定比例和结构形成。组织工程学的主要方法是将种子细胞种植到具有一定空间结构的三维支架上,通过细胞间的相互粘附、增殖与分化,分泌细胞外基质,并从生长环境中吸取生长营养物质,从而形成具有一定结构和功能的组织或器官。生物相容性好,可被降解吸收的组织工程支架材料被称为细胞外基质材料,可以为细胞提供良好的生存环境,使细胞获得足够的营养和进行气体交换,使细胞沿预制形态的三维支架生长^[13]。

细胞外基质结构可以为细胞提供空间和机械刺激从而引导细胞行为。细胞与细胞外基质之间的物理作用调节原始细胞程序,包括分化、迁移和增殖^[14]。侯光辉等^[15]将人骨髓间充质干细胞种于猪眼球角膜基质上成功诱导干细胞向上皮样细胞发育。Ryu等^[16]将大鼠骨髓间充质干细胞与纤维蛋白基质混合后注射到心肌梗模型大鼠的心梗区,发现增强了新生血管形成以及血管平滑肌细胞再生,从而改善了心肌功能,而且作用强于单独注射骨髓间充质干细胞组。认为纤维蛋白基质增强了干细胞归巢,增强了干细胞对心梗的修复作用。Wu等^[17]利用人脂肪组织进行脱细胞处理后制作出脂肪基质生物支架,分别进行体内外试验发现这种脂肪

来源的基质与脂肪来源的干细胞复合后可以支持干细胞的增殖并促进其向脂肪细胞分化。将这种基质植入大鼠皮下后,只引起了轻微的炎症反应,移植后的基质部位有新的脂肪组织的生成并血管化,移植部位周围细胞迁移入基质中。Choi等^[18]利用猪脂肪组织来源的基质同样证明了以上观点。细胞外基质还会影响血管网络的形成和上皮细胞的形态发生^[19-20]。不同硬度的基质材料可以诱导间充质干细胞向不同谱系细胞分化,如在模拟脑组织弹性特点的基质中,间充质干细胞细胞形态富于丝状伪足,在模拟横纹肌组织环境的中等硬度的基质材料中,间充质干细胞形态类似于C2C12成肌细胞,在更强硬度的模拟骨细胞微环境特点的基质中,间充质干细胞形态为类似于成骨细胞的多角形。细胞对基质弹性的反应过程是通过非肌肉肌球蛋白Ⅱ通过黏着斑进行的力量传导实现的。基质硬度不仅影响细胞形态,也影响了细胞基因的表达^[21-22]。不仅基质硬度影响细胞行为,基质微形态也会影响细胞的形态和功能。3D纳米结构影响着间充质干细胞的形态和分化。Kulangara等^[23]将人骨髓间充质干细胞种于聚二甲基硅氧烷材料制成的具有350nm纹理结构的3D支架表面进行培养,发现细胞的迁移速度明显高于2D平坦平面的细胞。进一步研究发现在纳米支架材料上生长的MSC斑联蛋白被下调了,从而形成了更小更具活动性的黏着斑,这就更利于细胞的迁移。黏着斑具有多种功能,不仅能够介导细胞——基质粘附和压力传导,还影响细胞骨架的调节和附着依赖性的信号发送。斑联蛋白是成熟黏着斑的标记物,也是感知和传导压力的关键物。细胞外基质不仅影响正常的生理过程,也在疾病病理过程中发挥重要作用。细胞外基质的破坏和异常组建过程可能导致先天缺陷以及组织纤维化和癌症等疾病的发生发展^[24-25]。

1.3 可溶性信号分子的影响

细胞微环境中的可溶性信号分子在细胞的生长分化以及细胞功能的发挥中起着重要作用。生长因子能够通过绑定到特异高亲和力的细胞膜绑定受体刺激细胞增殖。常作为细胞间的信号分子。生长因子和生长因子受体在生长发育、创伤修复、血管形成中扮演重要角色,具有多种生理功能。组织工程中常用的细胞因子有转化生长因子- β (TGF- β)、骨形态发生蛋白(BMP)、成纤维细胞生长因子(FGF)、表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、软骨调节素-I(CHM-I)、血小板衍化生长

因子(PDGF)、角朊细胞生长因子(KGF)、肝细胞生长因子(HGF)、神经生长因子(NGF)等等^[26]。Herrmann等^[27]研究发现经过TGF- α 预处理的骨髓间充质干细胞对缺血心肌的修复作用强于未经TGF- α 处理的干细胞。Nakajima等^[28]研究发现FGF10通过MAOPK1/3通路刺激假复层上皮细胞形成多层细胞,而FGF9抑制新生小鼠上皮分化。表皮生长因子作为一种细胞分裂素可以通过调节细胞周期促进人羊膜上皮细胞增殖^[29]。激素在干细胞增殖分化过程中同样发挥重要作用。杜杰等^[30]用碱性成纤维细胞生长因子与表皮生长因子诱导骨髓间充质干细胞向神经干细胞方向分化,再用甲状腺激素诱导神经干细胞向少突胶质细胞分化。陈昕等^[31]研究发现适当浓度 β -雌二醇可以增强老年大鼠脂肪干细胞增殖以及向成骨细胞的分化。朱晓斐等^[32]研究了17 β -雌二醇对小鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导过程的影响发现雌二醇促进骨髓间充质干细胞成骨基因RUNX2、OCN mRNA及RUNX2、SP7蛋白的表达,且浓度为 10^{-9} mol/L的雌激素作用最明显,说明雌二醇能够剂量依赖性地促进干细胞的成骨分化。在对雌激素影响移植骨髓间充质干细胞凋亡的研究中发现,雌激素浓度与miR-21的表达量呈正相关,表明miR-21可能与雌激素对间充质干细胞凋亡的抑制作用有关^[33]。在干细胞增殖分化的过程中常常是多种可溶性信号分子共同的作用结果。如在诱导间充质干细胞向各种不同细胞谱系分化的过程中,不同诱导培养液的成分各不相同。如常用体外MSC成骨诱导培养液的成分含有地塞米松、维生素C和 β -甘油磷酸钠、TGF- β 、BMP、VitD3。成脂诱导培养液的成分含有吡啶美辛、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、胰岛素、地塞米松^[34]。

1.4 其他微环境影响因素

影响组织微环境的因素还有温度、pH值、氧浓度、离子浓度等。李宁等^[35]将大鼠骨髓间充质干细胞在不同氧浓度条件下培养,观察细胞增殖情况发现适宜的高压氧环境对间充质干细胞的增殖具有促进作用。而黄姣^[36]研究低氧微环境对骨髓间充质干细胞成骨分化影响的研究中却发现,低氧微环境尤其是4% O₂分压环境下明显促进骨髓间充质干细胞的增殖。低氧微环境抑制骨髓间充质干细胞ALP、Col I的表达,表明低氧环境会抑制骨髓间充质干细胞成骨分化。Xu等^[37]则发现低氧条件诱导Notch1的表达和Notch信号的活化,从而抑制间充质干细胞的成骨分化。郑景辉等^[38]

研究了不同血清环境对大鼠骨髓间充质干细胞体外培养的影响,发现无血清环境下培养的骨髓间充质干细胞纯度明显低于含血清微环境,大鼠自身血清环境更利于骨髓间充质干细胞的贴壁、生长和纯化。炎症过程同样影响着干细胞的命运,既是干细胞募集和增殖分化的刺激因子,也是使干细胞相关疾病发生的诱因^[39]。

由上可知,多种因素影响着细胞的生长,而微环境对细胞的影响常常是这些因素共同作用的结果。Ma等^[40]利用一种综合了多种条件的器官型培养系统模拟损伤皮肤条件成功诱导骨髓间充质干细胞向复层表皮样细胞分化。在这个培养系统中将成纤维细胞包被在胶原蛋白基质中作为MSC生长的基质,加入角化细胞培养液和表皮生长因子、氢化可的松、胰岛素、三碘原氨酸和VD3,培养在气液平面条件下,在这种综合了可溶性生化因子、间质细胞、微环境物理特性等因素成功模拟了损伤皮肤微环境使骨髓间充质干细胞向复层表皮样细胞分化。体内微环境是细胞生长的特异环境,在不同的体内微环境中,干细胞能够向特定功能的成熟细胞分化。Nagori等^[41]将一位患有严重Asheman综合征的患者的骨髓间充质干细胞中标记CD9、CD90和CD133的子宫内膜血管形成干细胞筛选出来植入该患者宫腔,辅以雌孕激素序贯治疗,使子宫内膜再生并具有正常功能,用IVF-ET技术使该患者成功受孕。王振显等^[42]应用膀胱组织匀浆上清液作为干细胞微环境条件,成功诱导大鼠间充质干细胞向平滑肌样细胞分化。刘芳等^[43]应用子宫匀浆上清液联合雌激素模拟子宫微环境成功诱导兔骨髓间充质干细胞向内膜上皮细胞方向分化。

2 模拟体内微环境的仿生组织工程支架

组织工程支架是组织工程的重要组成部分,它为种子细胞的生长提供适宜微环境,在利于种子细胞生长分化的同时还要具有组织相容性和生物降解性。无论是材料的还是支架的制备工艺的选择,都是利用仿生学原理,最大程度模拟特定细胞微环境,使细胞支架复合物能够修复或替代损伤或缺失的器官组织。

2.1 组织工程支架材料

良好的组织工程支架材料应具备几个特点:(1)良好的生物相容性;(2)生物可降解性;(3)利于细胞生长;(4)具备一定强度和良好的可塑性。按其来源可以分为天然生物材料和人工合成生物材料。天然生物材

料包括胶原、壳聚糖、丝素蛋白、胶原蛋白、藻酸盐、小肠粘膜下基质、羊膜细胞外基质、脱细胞真皮基质、脱细胞脂肪基质、羟基磷灰石等等。人工合成生物材料包括聚羟基乙酸(PGA)、聚乳酸(PLA)、PLGA、聚碳酸酯、聚酸酐等等。依据不同组织和细胞的特点应用不同材料所制备生物材料支架。

2.2 组织工程支架的研究进展及应用

由于细胞生长在平坦的表面形态的2D结构中会失去其在组织中的基本功能,并表现出不同的细胞形态,并且细胞间、细胞与基质间的相互作用也不同。而3D的培养体系能够克服这种不足,不但可以给细胞提供足够的空间,利于细胞粘附生长、基质沉积、氧气养分进入一级代谢物排除,还有利于血管和神经长入,从而更好地模拟细胞微环境促进细胞生长分化^[44-45]。所以3D结构形态基质与2D结构形态基质相比更接近体内组织微环境。

2.2.1 天然组织工程支架 小肠粘膜下基质(small intestinal submucosa SIS)、羊膜、脱细胞真皮基质、膀胱脱细胞基质等。这些来自于动物体的细胞外基质具有自然的3D微结构,无细胞成分,已经广泛用于组织工程研究。Kropp等^[46]应用猪小肠下黏膜基质成功修复SD大鼠的膀胱缺损。李庆林等^[47]应用猪小肠粘膜下层无细胞基质作为兔阴道平滑肌细胞生长的载体,发现SIS具有良好的细胞相容性,对平滑肌细胞的生长和功能表达无明显抑制作用。谭波等^[48]将食管黏膜上皮细胞与SIS复合培养发现食管黏膜上皮细胞生长良好并分层。羊膜也可作为组织工程支架,与角膜基质融合,作为角膜缘干细胞利基促进角膜缘上皮干细胞再生,从而治疗角膜溃疡等角膜损伤^[49-50]。Mohamed等^[51]应用羊膜移植到患有严重宫腔粘连的患者宫腔内,2月后经过内膜组织活检发现了内膜间质细胞和柱状上皮细胞再生,提出羊膜可能作为内膜再生的干细胞治疗的支架来源。闫国和等^[52]应用人羊膜负载骨髓间充质干细胞和表皮细胞用于放创性皮肤损伤修复研究发现,羊膜与骨髓间充质干细胞和表皮细胞复合物促进皮肤损伤修复。张明乐等^[53]将小鼠阴道上皮细胞种植在猪脱细胞真皮基质-纤维蛋白凝胶支架埋植于小鼠皮下,发现阴道细胞随时间延长而复层化,由4周的2~3层到12周的4~5层。耿献辉等^[54]应用骨髓间充质干细胞与脱细胞真皮基质复合培养,构建组织工程皮肤,发现骨髓间充质干细胞在表面形成了3~5层细胞的类表皮结构,在下层形成了类真皮结构。Xu等^[55]

应用猪脱细胞真皮组织成功进行了非洲绿猴的肩袖修复重建,发现脱细胞真皮与肌腱融合,而且无明显过敏反应出现。Zhu等^[56]将兔自体脂肪间充质干细胞与异体兔膀胱脱细胞基质复合后移植到缺损膀胱部位,观察12周后发现膀胱缺损部位修复良好,并用单纯移植膀胱基质组作为对照,发现与干细胞复合组的膀胱容量明显高于对照组,且移植部位见大量平滑肌细胞,与正常膀胱非常接近,证实了膀胱脱细胞基质作为膀胱修复材料的可行性,而且干细胞增强了修复作用。这些动物来源的细胞基质具有良好的三维结构和活性因子,是组织工程生物材料的理想来源。但这些材料也存在着一些缺点,如免疫排斥、传播疾病、结构不可控性等。

2.2.2 人工合成组织工程支架 人工合成细胞支架可以模拟不同组织特点形成不同结构和形貌以满足不同细胞生长要求。传统的制备工艺包括溶剂浇铸/粒子沥滤、冷冻干燥、纤维粘结、乳化/冻干等方法。赵莉等^[57]将不同比例的PLGA材料应用溶液浇注/颗粒沥滤法制备成多孔支架,将人真皮成纤维细胞接种到细胞支架上,观察支架的物理及生物性能。结果表面随PLA比例增加,支架力学强度增加,降解速度降低。成纤维细胞能够在支架表面良好生长,并能分泌大量细胞外基质。林小敏等^[58]用冷冻干燥法制备了一种壳聚糖-明胶-透明质酸-硫酸肝素复合支架并观察了海马神经细胞在该支架上的生长情况,发现该支架具有较高的孔隙率和细胞附着率,且细胞有较强的增殖能力。张文元等^[59]将丝素蛋白与壳聚糖复合共混,应用冻干技术制作了一种三维多孔支架,并将兔骨髓间充质干细胞置于支架上。研究发现该支架具有84.2%的孔隙率,孔径在100 μm ~160 μm 之间,MSC在支架空隙中良好生长、增殖并分泌基质。

研究证明支架孔径大小以及孔隙率影响细胞的增殖分化。Oh等^[60]应用离心分离法制备的梯度孔径细胞PCL材料支架,并将不同类型细胞种植于支架中,观察到不同的细胞分布在不同的支架孔径中生长,如380 μm ~405 μm 适合软骨细胞和成骨细胞生长,186 μm ~200 μm 孔径中适合成纤维细胞生长,290 μm ~310 μm 孔径适合新骨形成。不同的材料成分和纳米结构也对于干细胞的分化产生不同的影响^[61]。纳米结构材料更利于细胞的生长分化和细胞功能的表达。Elias等^[62]将人成骨细胞分别培养在纳米碳纤维材料(直径<100nm)和传统碳纤维材料上(直径>100nm),发现纳

米碳纤维材料可以加快细胞增殖,而且成骨细胞碱性磷酸酶合成和细胞外钙盐沉积均高于传统材料。Dalby 等^[63]制作了聚苯乙烯-对溴苯乙烯复合材料纳米支架,发现这种纳米结构的支架可以刺激骨祖细胞向成骨细胞表型分化。具有纳米表面形貌的细胞支架可以改变人间充质干细胞的黏着斑、细胞骨架和力学特性,从而影响细胞的生长和功能改变^[23,64]。Mahairaki 等^[65]应用静电纺丝技术制作出不同直径和形态的 PCL 纤维基质,研究纤维直径对人胚胎干细胞来源的神经前体细胞生长和分化的影响。发现神经前体细胞在规则整齐的纤维基膜上向神经细胞分化强于不规则纤维基膜,而且规则纤维基膜中纳米结构对细胞分化的影响强于微米结构基膜。由此可以看出这种规则的纳米纤维材料可以作为神经分化的基质模拟促进神经分化的微环境。Jiang 等^[66]应用静电纺丝技术制作了可以持续释放维甲酸的 PCL 纳米纤维支架,发现这种纳米结构和持续的维甲酸释放增强了干细胞神经细胞标记物表达,说明这种支架促进了干细胞向神经细胞分化。许多研究已经发现了纳米结构基质可以改变粘着斑的形成,认为整合素可以通过黏着斑将细胞外机械信号转换为生化信号从而影响细胞的迁移、生长和分化^[14,23,64]。

组织工程支架的微细结构、理化性能等参数影响着细胞命运,而传统的制备工艺存在孔隙率、孔径、空间构型可控性差的缺点,常常不能精细控制支架结构,不利于细胞的生长分化,因此三维精密加工技术越来越多地受到人们重视。结合了计算机辅助设计的快速成型技术如扫描电子束刻蚀技术、聚焦离子束光刻技术、双光子聚合技术等结合可以制作高精密材料。Zhang 等^[67]开发了一种叫做动态光学投射立体打印(DOPsL)技术,这种技术包含一个计算机投射系统和一个微控微镜面,将紫外光投射到含光敏聚合物和细胞的溶液中的某个特定区域,使投射区的溶液在光诱导下固化,从而形成含有细胞的 3D 结构。制作过程时间非常短,可以在数秒内制作出预先设计好的特定形态的可以引导细胞间相互作用的生物降解材料支架。Fielding^[68]用 3D 打印机制作了添加 SiO₂ 和 ZnO 的磷酸三钙材料骨组织工程支架,体内研究发现这种支架具有很高的强度,满足了替代骨的需求。也有人用 3D 打印机制作出耳廓模具,将软骨细胞和胶原蛋白混合注入模具制作出具有生物活性的人造耳廓^[69-70]。虽然这种人造 3D 器官在形态上与正常器官高度相似,但要

使其能够成为具有完整功能的正常器官还需要更多的研究。

3 总 结

组织微环境决定了细胞的命运。细胞-细胞之间、细胞-基质之间的相互作用和可溶性细胞分子以及各种离子是细胞生长的必须组成部分,动态的时空变化也是影响细胞生长的重要因素^[71]。组织工程支架的制作不仅要在空间结构上模拟细胞微环境特点,还要具备综合多种影响细胞生长因素的能力,促进细胞增殖与分化必需的生物信号分泌,从而达到最大程度的仿生性能。人们已经认识到细胞微环境对细胞的影响以及组织工程支架在组织再生中扮演着重要角色。细胞微环境的研究和组织工程支架的研究相互促进。生物支架材料的选择和制备工艺的研究还有很广阔的空间,计算机辅助设计等新技术的应用将在组织工程支架研究中发挥巨大作用。

参考文献

- [1] Moore K A, Lemischka I R. Stem cells and their niches. *Science*, 2006, 311(5769): 1880-1885.
- [2] 刘晓芳,王延洲,徐惠成,等. 微环境对间充质干细胞向平滑肌细胞定向分化的影响. *细胞生物学杂志*, 2009, 31(5): 621-624.
Liu X F, Wang Y Z, Xu H C, et al. The effect of microenvironment on mesenchymal stem cells differentiation directed to smooth muscle cell. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2009, 31(5): 621-624.
- [3] Cunha G R, Fuji H, Neubauer B L. Epithelial-mesenchymal interactions in prostatic development. I. Morphological observations of prostatic induction by urogenital sinus mesenchyme in epithelium of the adult rodent urinary bladder. *The Journal of Cell Biology*, 1983, 96: 1662-1670.
- [4] Cunha G R. Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate. *Cancer*, 1994, 74(3 Suppl): 1030-1044.
- [5] Rubio D, Garcia S, De la Cueva, et al. Human mesenchymal stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition. *Experimental Cell Research*, 2008, 314(4): 691-698.
- [6] Keiko Inada, Shinji Hayashi, Taisen Iguchi, et al. Establishment of a primary culture model of mouse uterine and vaginal stroma for studying *in vitro* estrogen effects. *Experimental Biology and Medicine*, 2006, 231(3): 303-310.

- [7] Jiarong Liu, Jeremy J Mao, Lili Chen. Epithelial-mesenchymal interactions as a working concept for oral mucosa regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2011, 17(1): 25-31.
- [8] 张媛,郭维,胡吟燕,等. 大鼠耳蜗毛细胞前体细胞与耳蜗间质细胞共培养的实验研究. *听力学及言语疾病杂志*, 2007, 15(3): 205-207.
- Zhang Y, Guo W, Hu Y Y, et al. Co-culture of hair cell progenitor and mesenchymal cell from rat cochlea. *Journal of Audiology and Speech Pathology*, 2007, 15(3): 205-207.
- [9] 张雯碧,程明军,徐从剑. 小鼠骨髓间充质干细胞向子宫内膜上皮细胞方向分化的体外实验. *现代妇产科进展*, 2010, 19: 257-260.
- Zhang W B, Cheng M J, Xu C J. *In vitro* study on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into endometrial epithelial cells in mice. *Progress in Obstetrics and Gynecology*, 2010, 19: 257-260.
- [10] 陈寅,马南,梅举,等. 体外诱导人骨髓间充质干细胞向Ⅱ型肺泡上皮细胞分化. *中国组织工程研究*, 2012, 16(10): 1737-1741.
- Chen Y, Ma N, Mei J, et al. *In vitro* induction of human bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into type II alveolar epithelial cells. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2012, 16(10): 1737-1741.
- [11] Liu J, Huang J, Lin T, et al. Cell-to-cell contact induces human adipose tissue-derived stromal cells to differentiate into urothelium-like cells *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 390(3): 931-936.
- [12] Atula S, Grenman R, Syrjänen S. Fibroblasts can modulate the phenotype of malignant epithelial cells *in vitro*. *Experimental Cell Research*, 1997, 235(1): 180-187.
- [13] 丁斐,刘伟,顾晓松. 再生医学. 北京:人民卫生出版社, 2012. 67.
- Ding F, Liu W, Gu X S. *Regenerative Medicine*. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012. 67.
- [14] Kim D H, Provenzano P P, Smith C L, et al. Matrix nanotopography as a regulator of cell function. *Journal of Cell Biology*, 2012, 197(3): 351-360.
- [15] 侯光辉,叶楠,吴静,等. 人骨髓间充质干细胞分化为上皮样细胞的初步研究. *中华眼科杂志*, 2010, 46(8): 719-724.
- Hou G H, Ye N, Wu J, et al. Preliminary study on human bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into epithelial-like cells. *Chinese Journal of Ophthalmology*, 2010, 46(8): 719-724.
- [16] Ryu J H, Kim I K, Cho S W, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularization in infarcted myocardium. *Biomaterials*, 2005, 26(3): 319-326.
- [17] Wu L, Nahas Z, Kimmerling K A, et al. An injectable adipose matrix for soft-tissue reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2012, 129(6): 1247-1257.
- [18] Choi Y C, Choi J S, Kim B S, et al. Decellularized extracellular matrix derived from porcine adipose tissue as a xenogeneic biomaterial for tissue engineering. *Tissue Engineering: Part C*, 2012, 18(11): 866-876.
- [19] Labouesse M. Role of the extracellular matrix in epithelial morphogenesis. *Organogenesis*, 2012, 8(2): 65-70.
- [20] Mettouchi A. The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis. *Cell Adhesion & Migration*, 2012, 6(6): 528-534.
- [21] Engler A J, Sweeney H L, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 2006, 126(4): 677-689.
- [22] Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation *in vitro*—A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in Cancer Biology*, 2005, 15(5): 405-412.
- [23] Kulangara K, Yang Y, Yang J, et al. Nanotopography as modulator of human mesenchymal stem cell function. *Biomaterials*, 2012, 33(20): 4998-5003.
- [24] Lu P, Takai K, Weaver V M, et al. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 2011, 3(12): a005058.
- [25] Sodek K L, Murphy K J, Brown T J, et al. Cell-cell and cell-matrix dynamics in intraperitoneal cancer metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 2012, 31(1-2): 397-414.
- [26] 丁斐,刘伟,顾晓松. 再生医学. 北京:人民卫生出版社, 2012, 71-74.
- Ding F, Liu W, Gu X S. *Regenerative Medicine*. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012, 71-74.
- [27] Herrmann J L, Abarbanell A M, Wang Y, et al. Transforming growth factor- α enhances stem cell-mediated postischemic myocardial protection. *Annals of Thoracic Surgery*, 2011, 92(5): 1719-1725.
- [28] Nakajima T, Hayashi S, Iguchi T, et al. The role of fibroblast growth factors on the differentiation of vaginal epithelium of neonatal mice. *Differentiation*, 2011, 82(1): 28-37.
- [29] Fatimah S S, Tan G C, Chua K H, et al. Effects of epidermal growth factor on the proliferation and cell cycle regulation of cultured human amnion epithelial cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 114(2): 220-227.
- [30] 杜杰,高小青,吴岩,等. 甲状腺激素对大鼠骨髓间充质干细胞分化为少突胶质细胞的影响. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(1): 31-34.
- Du J, Gao X Q, Wu Y, et al. Effects of thyroid hormone on differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into

- oligodendrocytes. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2009, 13(1): 31-34.
- [31] 陈昕,丁寅,蔡川,等. 雌激素对老年大鼠脂肪干细胞体外诱导成骨能力的影响. *口腔医学研究*, 2010, 26(3): 340-342.
- Chen X, Ding Y, Cai C, et al. Role of 17- β estradiol in osteogenic differentiation of rat adipose-derived stromal cells. *Journal of Oral Science Research*, 2010, 26(3): 340-342.
- [32] 朱晓斐,王颀,金岩,等. 雌激素剂量依赖性促进小鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化. *中国组织工程研究*, 2012, 16(19): 3433-3437.
- Zhu X F, Wang Y, Jin Y, et al. Estrogen promotes osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells in a dose-dependent manner. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2012, 16(19): 3433-3437.
- [33] 程姝丽,丁寅. 雌激素对小鼠骨髓间充质干细胞凋亡的抑制作用及其机制研究. *细胞分子免疫学杂志*, 2012, 28(5): 514-516.
- Cheng S L, Ding Y. Research of estrogen's inhibition on mouse bone marrow mesenchymal stem cells' apoptosis and its mechanism. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2012, 16(19): 3433-3437.
- [34] Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(2): 463-477.
- [35] 李宁,吴桂英,李启明,等. 不同氧浓度微环境对大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响实验研究. *重庆医学*, 2009, 38(8): 891-893.
- Li N, Wu G Y, Li Q M, et al. Effects of different oxygen concentration microenvironment on the proliferation of rat bone marrow stromal stem cells. *Chongqing Medicine*, 2009, 38(8): 891-893.
- [36] 黄姣. 低氧微环境对骨髓间充质干细胞成骨分化影响的研究. 重庆:重庆医科大学, 2012.
- Huang J. The study of the effect of hypoxia on osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in rats. Chongqing: Chongqing Medical University, 2012.
- [37] Xu N, Liu H, Qu F, et al. Hypoxia inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts by activation of Notch signaling. *Experimental and Molecular Pathology*, 2013, 94(1): 33-39.
- [38] 郑景辉,李勇华,王丽萍,等. 不同血清微环境对大鼠骨髓间充质干细胞体外培养的影响. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(14): 2497-2502.
- Zheng J H, Li Y H, Wang L P, et al. Effects of different serum microenvironments on culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2010, 14(14): 2497-2502.
- [39] 孔祥伟,丁寅,金岩. 炎症与干细胞: niche——不只是温床. *医学争鸣*, 2012, 3(2): 21-23.
- Kong X W, Ding Y, Jin Y. Inflammation and stem cells: niche - not just hotbed. *Negative*, 2012, 3(2): 21-23.
- [40] Ma K, Laco F, Ramakrishna S, et al. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into multi-layered epidermis-like cells in 3D organotypic coculture. *Biomaterials*, 2009, 30(19): 3251-3258.
- [41] Nagori C B, Panchal S Y, Patel H. Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by *in vitro* fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome. *Human Reproductive Sciences*, 2011, 4(1): 43-48.
- [42] 王振显,蔡文清,宋永周,等. 膀胱匀浆上清液在大鼠骨髓间充质干细胞诱导分化为平滑肌样细胞中的作用. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(8): 1422-1425.
- Wang Z X, Cai W Q, Song Y Z, et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into smooth muscle cells *in vitro* induced by the supernatant of homogenized bladders. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2008, 12(8): 1422-1425.
- [43] 刘芳,何援利. 模拟子宫内膜微环境体外诱导骨髓间充质干细胞向子宫内膜上皮细胞分化的实验研究. *现代妇产科进展*, 2012, 21(11): 878-881.
- Liu F, He Y L. Differentiation of rabbits bone marrow mesenchymal stem cells into endometrial epithelial cells in simulate endometrial microenvironment *in vitro*. *Progress in Obstetrics and Gynecology*, 2012, 21(11): 878-881.
- [44] Pampalni F, Reynaud E G, Stelzer E H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(10): 839-845.
- [45] Ghibaudo M, Trichet L, Le Digabel J, et al. Substrate topography induces a crossover from 2D to 3D behavior in fibroblast migration. *Biophysical Journal*, 2009, 97(1): 357-368.
- [46] Kropp B P, Eppley B L, Prevel C D, et al. Experimental assessment of small intestinal submucosa as a bladder wall substitute. *Urology*, 1995, 46(3): 396-400.
- [47] 李庆林,刘伟,李文芳,等. 小肠粘膜下层无细胞基质作为阴道平滑肌细胞载体的可行性. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(47): 8741-8746.
- Li Q L, Liu W, Li W F, et al. Feasibility of small intestinal submucosa acellular matrix as vaginal smooth muscle cell carrier. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2010, 14(47): 8741-8746.
- [48] 谭波,魏人前,杨志明,等. 食管黏膜上皮细胞与 SIS 复合培养及生物学特性研究. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(6): 742-746.
- Tan B, Wei R Q, Yang Z M, et al. An experimental study of

- coculture of esophageal mucosa epithelial cells with SIS and their biological characteristics. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2008, 22(6): 742-746.
- [49] Nubile M, Dua H S, Lanzini M, et al. *In vivo* analysis of stromal integration of multilayer amniotic membrane transplantation in corneal ulcers. American Journal of Ophthalmology, 2011, 151(5): 809-822.
- [50] Shay E, Kheirkhah A, Liang L, et al. Amniotic membrane transplantation as a new therapy for the acute ocular manifestations of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. Survey of Ophthalmology, 2009, 54(6): 686-696.
- [51] Mohamed I. Amer, Karim Abd-El-Maeboud, Amal Alloub. Anion graft as a possible source of stem cells for endometrial regeneration after lysis of severe intrauterine adhesions. Middle East Fertility Society Journal, 2012, 17(1): 54-56.
- [52] 闫国和, 栗永萍, 艾国平, 等. 羊膜负载骨髓间充质干细胞与表皮细胞对放射性皮肤损伤促愈合研究. 中国修复重建外科杂志, 2004, 18(6): 497-501.
- Yan G H, Su Y P, Ai G P, et al. Study on amniotic membrane loaded with marrow mesenchymal stem cells and epidermis cells on promoting healing of wound combined with radiation injury. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2004, 18(6): 497-501.
- [53] 张明乐, 黄向华, 李雅钗, 等. 小鼠阴道上皮细胞与猪脱细胞真皮基质-纤维蛋白凝胶构建组织工程阴道的初步研究. 实用妇产科杂志, 2012, 28(8): 639-642.
- Zhang M L, Huang X H, Li Y C, et al. Primary experimental study on tissue engineering vagina constructed by mouse vaginal epithelial cells and porcine acellular dermal matrix (PADM)-Fibrin gel. Journal of Practical Obstetrics and Gynecology, 2012, 28(8): 639-642.
- [54] 耿献辉, 余春艳, 邓志宏, 等. 骨髓间充质干细胞复合组织工程化脱细胞真皮基质构建组织工程皮肤. 中国美容医学, 2007, 16(4): 443-446.
- Geng X H, Yu C Y, Deng Z H, et al. Construction of tissue-engineered skin with BMSCs and tissue-engineered acellular dermal matrix. Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2007, 16(4): 443-446.
- [55] Xu H, Sandor M, Qi S, et al. Implantation of a porcine acellular dermal graft in a primate model of rotator cuff repair. Journal of Shoulder and Elbow Surgery, 2012, 21(5): 580-588.
- [56] Zhu W D, Xu Y M, Feng C, et al. Bladder reconstruction with adipose-derived stem cell-seeded bladder acellular matrix grafts improve morphology composition. World Journal of Urology, 2010, 28(4): 493-498.
- [57] 赵莉, 何晨光, 高永娟, 等. PLGA 的不同组成对支架材料性能的影响研究. 中国生物工程杂志, 2008, 28(5): 22-28.
- Zhao L, He C G, Gao Y J, et al. Study on influence of copolymer compositions of PLGA on properties of scaffolds. China Biotechnology, 2008, 28(5): 22-28.
- [58] 林小敏, 关水, 葛丹, 等. 壳聚糖-明胶-透明质酸-硫酸肝素复合支架的制备及性能评价. 高校化学工程学报, 2012, 26(2): 265-270.
- Lin X M, Guan S, Ge D, et al. Fabrication and characteristics of chitosan-gelatin-hyaluronate-heparan sulfate scaffolds. Journal of Chemical Engineering of Chinese University, 2012, 26(2): 265-270.
- [59] 张文元, 杨亚冬, 房国坚. 壳聚糖-丝素复合支架材料与骨髓间充质干细胞相容性的研究. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(12): 3084-3086.
- Zhang W Y, Yang Y D, Fang G J. Cytocompatibility study of chitosan-silk fibroin composite scaffold material with BMSCs *in vitro*. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2010, 20(12): 3084-3086.
- [60] Oh S H, Park I K, Kim J M, et al. *In vitro* and *in vivo* characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. Biomaterials, 2007, 28(9): 1664-1671.
- [61] Ilie I, Ilie R, Mocan T, et al. Influence of nanomaterials on stem cell differentiation: designing an appropriate nanobiointerface. International Journal of Nanomedicine, 2012, 7: 2211-2225.
- [62] Elias K L, Price R L, Webster T J. Enhanced functions of osteoblasts on nanometer diameter carbon fibers. Biomaterials, 2002, 23(15): 3279-3287.
- [63] Dalby M J, McCloy D, Robertson M, et al. Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. Biomaterials 2006, 27(15): 2980-2987.
- [64] Yim E K, Darling E M, Kulangara K, et al. Nanotopography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells. Biomaterials, 2010, 31(6): 1299-1306.
- [65] Mahairaki V, Lim S H, Christopherson G T, et al. Nanofiber matrices promote the neuronal differentiation of human embryonic stem cell-derived neural precursors *in vitro*. Tissue Engineering: Part A, 2011, 17(5-6): 855-863.
- [66] Jiang X, Cao H Q, Shi L Y, et al. Nanofiber topography and sustained biochemical signaling enhance human mesenchymal stem cell neural commitment. Acta Biomaterialia, 2012, 8(3): 1290-1302.
- [67] Zhang A P, Qu X, Soman P, et al. Rapid fabrication of complex 3D extracellular microenvironments by dynamic optical projection stereolithography. Advanced Materials. 2011, 24(31): 4266-4270.
- [68] Fielding G, Bose S. SiO₂ and ZnO dopants in three-dimensionally

- printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds enhance osteogenesis and angiogenesis *in vivo*. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9(11): 9137-9148.
- [69] Cervantes T M, Bassett E K, Tseng A, et al. Design of composite scaffolds and three-dimensional shape analysis for tissue-engineered ear. *Journal of The Royal Society Interface*, 2013, 10(87): 20130413.
- [70] Reiffel A J, Kafka C, Hernandez K A, et al. High-fidelity tissue engineering of patient-specific auricles for reconstruction of pediatric microtia and othauricular deformities. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56506.
- [71] Hui E E, Bhatia S N. Micromechanical control of cell-cell interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(14): 5722-5726.

The Effects of Microenvironment on Cells and The Application of Bionics in Tissue Engineering Scaffolds

ZHANG Zhi-qiang HUANG Xiang-hua ZHAO Lin-yuan

(The Second Hospital of HeBei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract Microenvironment effects proliferation, migration and functions of cells. The factors of microenvironment that effect fate of cells include interactions between cells and extracellular matrix, soluble signal molecules, anoxia and nutrition. To prepare engineering tissue scaffold need to simulate the cells microenvironment furthest following the bionics theory so that the scaffold can be used in studies of cell behaviour and clinical therapy. Comprehensive understanding the effects factors of microenvironment on cells played an important role on tissue engineering scaffold preparation, and the studies about tissue engineering scaffold also promoted the knowledge about microenvironment effect on cells. Researches on tissue engineering scaffolds have broad prospects in the field of tissue engineering. And new preparation techniques also play a huge role in promoting the research on tissue engineering scaffold.

Key words Microenvironment Cell Bionics Tissue engineering scaffold